

L'EMBRYON DE POULET, MODÈLE D'ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DU TUBE DIGESTIF

THE CHICKEN EMBRYO, A MODEL FOR DIGESTIVE TRACT DEVELOPMENT

Par Florence BERNEX⁽¹⁾ et Pascal DE SANTA BARBARA⁽²⁾
(Communication présentée le 26 mai 2011)

RÉSUMÉ

Le poulet a été le premier modèle animal utilisé pour comprendre le processus extraordinairement complexe du développement embryonnaire. Ce modèle a permis, en particulier, la découverte des lignages cellulaires impliqués dans la constitution de la paroi musculaire digestive et des mécanismes moléculaires à l'origine de la structuration et de la régionalisation de la paroi digestive. On rappelle d'abord l'avancée réalisée, dès les années 1970, par la construction de chimères caille-poulet, qui ont permis l'identification de l'origine embryologique des neurones entériques et des cellules interstitielles de Cajal. Des études fonctionnelles sont désormais possibles chez le poulet grâce aux techniques de transfert de gènes et à l'analyse transcriptomique. Par des approches de perte ou de gain de fonction, on peut cibler le mésoderme viscéral qui participe à la constitution de la couche musculaire du tube digestif. Ainsi, ce modèle est encore promis à un bel avenir!

Mots-clés : embryon, poulet, perte et gain de fonction, cellules musculaires lisses.

SUMMARY

The chick embryo was the first animal model used to study the extraordinarily complex process of embryonic development. The chick model led to the discovery of cell lineages involved in the constitution of the digestive muscle wall and of the molecular mechanisms underlying the development of structures and patterning of the digestive wall. First we describe the breakthrough achieved in the 1970s with the construction of quail-chick chimeras, which led to the identification of the embryonic origin of enteric neurons and interstitial cells of Cajal. Functional studies are now possible based on gene transfer technics and transcriptomic analysis. Gain and loss of function approaches are used to target the visceral mesoderm, involved in the constitution of the muscle layer of the digestive tract. This model still holds many promises for the future!

Key words: embryo, chicken, gain- and loss- of function, smooth muscle cells.

INTRODUCTION

Le développement embryonnaire est un processus extraordinairement complexe, qui a toujours fasciné l'homme. Pour essayer de répondre aux questions fondamentales qu'il soulève, les scientifiques ont utilisé un certain nombre d'animaux-modèles, présentant des avantages différents et permettant des

approches expérimentales multiples et originales. Parmi eux ont été fréquemment utilisés le nématode *Caenorhabditis elegans*, la mouche *Drosophila melanogaster*, quelques espèces d'oursins, le poisson zèbre *Danio rerio*, la grenouille *Xenopus laevis*, le poulet *Gallus gallus* et la souris *Mus musculus*. Le poulet, premier modèle animal utilisé est toujours d'actualité.

(1) Maître de Conférences ENVA, chercheur invitée à l'Unité INSERM U1046 de Physiologie et médecine expérimentale du cœur et des muscles, Montpellier.

(2) Chargé de recherches, CR1 INSERM, responsable de l'équipe « développement du muscle lisse viscéral et pathologies associées ». INSERM U1046.

Son embryon offre de nombreux avantages car il permet un accès facile pour des manipulations chirurgicales dans l'œuf, telles que des transplantations tissulaires, l'implantation de cellules isolées ou de substrats chimiques autorisant la libération de facteurs humoraux spécifiques, des marquages cellulaires *in toto* et sur coupes ou des cultures cellulaires.

Le développement du tube digestif implique des interconnexions strictes entre les trois feuillets embryonnaires : l'endoderme à l'origine de l'épithélium de revêtement, l'ectoderme à l'origine du système nerveux entérique, et le mésoderme à l'origine de la majeure partie restante, notamment la couche musculaire. Chez le poulet comme chez l'homme, des processus similaires aboutissent à la mise en place du tube digestif, puis à une régionalisation de ce tube.

L'intérêt du modèle poulet a souffert de l'arrivée de l'ère moléculaire, surtout à cause de la difficulté à réaliser des expériences de mutagenèse dirigée ou des études de transgénèse comme chez la souris. Mais récemment des méthodes de transgénèse transitoire permettent d'obtenir une altération efficace de la fonction de gènes au cours du développement embryonnaire. Les approches de gain de fonction, en surexprimant ou en exprimant des gènes d'intérêt de façon ectopique, et celles de perte de fonction à partir de constructions dominant négatives, permettent d'étudier la fonction de gènes au cours du développement embryonnaire du poulet.

Nous nous sommes particulièrement intéressés au développement de la couche musculaire digestive et aux mécanismes moléculaires qui orchestrent l'organogenèse de cette couche dans le tube digestif.

Nous rappellerons en premier lieu l'apport des chimères caille-poulet dans la découverte de lignages cellulaires impliqués dans le développement de la paroi musculaire digestive et des mécanismes moléculaires sous-jacents. Puis, nous verrons comment des études fonctionnelles sont maintenant possibles chez le modèle-poulet grâce aux techniques de transfert de gènes et à la transcriptomique.

LES CHIMÈRES CAILLE-POULET

Nicole Le Douarin, de l'Institut d'Embryologie de Nogent sur Marne, a créé et remarquablement développé le modèle des chimères caille-poulet. Ces constructions sont un moyen très puissant pour suivre le devenir, la migration et la différenciation de cellules prélevées sur l'embryon de caille et transplantées dans des embryons de poulet receveurs (Le Douarin 1973). Elles lui ont permis de révéler le devenir de cellules dérivées de la crête neurale et leur implication, pour certaines, dans l'organisation du système nerveux entérique, constitué par des réseaux de neurones ou plexus localisés entre les couches musculaires de la paroi intestinale ou sous sa muqueuse.

Le principe de la méthode est fondé sur la similarité du développement *in vitro* de l'embryon de poulet de type Leghorn blanc et de celui de la caille commune, ainsi que sur la possibilité de

greffer un tissu d'un embryon de caille sur un embryon de poulet. Le marqueur naturel que représente l'aspect caractéristique du noyau, facile à visualiser sur des préparations microscopiques, permet un suivi permanent du devenir cellulaire et l'identification de l'origine caille ou poulet des cellules : cette astucieuse et originale façon de visualiser le génotype était ainsi proposée bien avant l'avènement des techniques de génétique moléculaire (Le Douarin & Teillet, 1973).

Ces auteurs (Le Douarin & Teillet, 1973) ont montré que les cellules de la crête neurale (CCN) vagues migrent dans le tube digestif en développement, prolifèrent, forment des plexus et se différencient en neurones et cellules gliales. Ces CCN vagues sont issues des somites 1 à 7, migrent dans une direction proximo-distale et forment la majorité du système nerveux entérique (SNE), sur la longueur entière du tube digestif. Elles suivent différents chemins selon la portion du tube digestif à coloniser (tube digestif antérieur, intestin pré-ombilical, ou intestin post-ombilical). Ce sont, par exemple, les CCN de la 28ème paire de somites qui contribuent à la formation du SNE dans la partie post-ombilicale.

La mise au point d'un anticorps monoclonal, le QCNP (*quail cell perinuclear specific marker*), qui reconnaît un antigène spécifique d'espèce, exprimé par toutes les cellules de caille mais par aucune des cellules de poulet, a permis d'affiner les résultats. Le marquage de cet anticorps a révélé, par immunohistochimie, que les cellules de la partie distale de la crête neurale vagale contribuent significativement au SNE de la partie distale du colon. Les CCN sacrales constituent jusqu'à 17% des neurones du SNE de cette région et forment aussi le nerf de Remak (Burns & Le Douarin, 1998).

Les chimères caille-poulet ont démontré que les cellules interstitielles de Cajal (ICC) du tube digestif ne dérivent pas des CCN mais sont d'origine mésodermique comme les cellules musculaires lisses (CML) (Lecoin *et al.* 1996).

ÉTUDES FONCTIONNELLES, APPLICATIONS AU MÉSODERME

L'une des stratégies les plus informatives pour appréhender les mécanismes génétiques contrôlant le développement embryonnaire ou le fonctionnement d'organes adultes est la manipulation génique. Ces stratégies sont limitées au développement précoce chez le xénope ou le poisson zèbre, sont coûteuses et difficiles chez la souris et, étaient jusqu'à peu, impossibles chez le poulet.

Récemment, la mise au point de la transgénèse transitoire permet une altération efficace de la fonction de gènes au cours du développement embryonnaire (Saura-Spengler & Barembaum, 2008). Des mutations gain de fonction, en surexprimant ou en exprimant des gènes d'intérêt de façon ectopique, ainsi que des mutations perte de fonction, ont été réalisées dans des constructions dominant négatives. Leurs effets phénotypiques ont ensuite été analysés.

Eudes fonctionnelles, méthodes

Techniques de transfert de gènes

Plusieurs techniques de transfert de gènes permettant une expression transitoire ont été mises au point chez le poulet.

La première, développée dans les années 1990, utilise des rétrovirus (Petrooulos *et al.* 1992) ; elle requiert une étape de clonage dans un vecteur rétroviral et l'infection virale des tissus à transfecter. Son avantage majeur est que l'ADN est intégré de façon stable dans le génome des cellules hôtes, ce qui permet une expression continue du gène transféré pendant une longue période. Les vecteurs rétroviraux les plus utilisés sont les RCAS (*Replication-Competent ASLV long terminal repeat (LTR) with a Splice acceptor*) : il s'agit d'une famille de vecteurs rétroviraux dérivés de la souche SR-A du virus du sarcome de Rous (RSV) qui acceptent des insertions de transgène dont l'expression locale est restreinte dans l'espace et dans le temps. Les vecteurs rétroviraux déficients en réplication sont utilisés de façon très efficace pour délivrer de petits RNA interférents (siRNA) permettant d'éteindre l'expression de gènes. Il existe des contraintes : la taille de l'ADN que l'on peut cloner dans les vecteurs rétroviraux est limitée (2,5 kilobases maximum) ; la préparation virale doit avoir un titre élevé ; l'expression du gène hôte n'est parfois détectée que 18 heures après le transfert. Pour accéder à l'embryon, une fenêtre est découpée dans la coquille de l'œuf et la solution d'ADN est injectée à l'aide d'une micropipette. Les œufs sont refermés hermétiquement et incubés à 37°C pour permettre la poursuite du développement de l'embryon et l'expression du gène transféré. Les embryons sont ensuite isolés et fixés afin d'analyser leur phénotype. L'utilisation d'un gène rapporteur permet de visualiser l'expression du transgène.

Deux autres techniques ont été utilisées, le bombardement de micro-particules contenant l'ADN et la lipofection (Furth 1997 ; Rosenblum & Chen, 1995). La seconde est fondée sur la capacité qu'ont les liposomes de fusionner avec les membranes cellulaires. Dans les deux cas, la concentration d'ADN à transférer n'est que très peu modulable.

Enfin on a fait appel à l'électroporation : le champ électrique appliqué sur la cible exposée interrompt, de façon transitoire, la stabilité de la membrane plasmique, crée des pores réversibles au travers desquels des acides nucléiques ou leurs analogues sont transportés dans le cytosol. Tout d'abord utilisée pour transférer de l'ADN dans des bactéries ou dans des cellules eucaryotes en culture, elle a été appliquée à la transfection d'ADN *in vivo* dans des tissus ou dans des embryons entiers (Itasaki *et al.* 1999 ; Momose *et al.* 1999). Elle a été mise au point pour le transfert de gènes dans le tube neural d'embryons de poulet. Après avoir injecté la solution d'ADN dans le tube neural, deux électrodes sont appliquées de chaque côté, parallèlement à l'axe longitudinal de l'embryon. L'impulsion électrique crée une différence de potentiel permettant l'entrée de l'ADN dans une seule direction, du côté du tube neural placé le long de l'anode. La molécule

d'ADN transfectée est généralement associée à un reporter, le GFP (*green fluorescent protein*), ce qui permet une détection facile des cellules électroporées (Saura-Spengler & barembaum, 2008). L'expression de la GFP est détectée quatre heures après l'électroporation, mais la protéine ciblée est considérée comme présente plus rapidement. L'électroporation *in vivo* est en théorie applicable à tout type de tissu ou d'organisme, à condition que le protocole soit ajusté selon le contexte expérimental. Par exemple, chez le poulet, si l'on place les électrodes de façon transversale par rapport à l'embryon, il est possible de cibler de façon spécifique l'endoderme, en injectant l'ADN dans la face ventrale de l'embryon (Grapin-Botton *et al.* 2001 ; de Santa Barbara & Roberts, 2002) ou l'ectoderme en appliquant l'ADN sur la surface dorsale de l'embryon (Itasaki *et al.* 1999). Cependant le mésenchyme et les autres tissus mous sont plus difficiles à cibler que l'épithélium bien délimité par sa membrane basale : l'électroporation des structures mésodermiques comme les muscles est très délicate (Dubrulle *et al.* 2001).

La transcriptomique

Le séquençage du génome du poulet a été réalisé dès 2004 (*International Chicken Genome Sequencing Consortium* 2004). Il a permis la mise au point de nouvelles technologies et ressources pour obtenir des profils d'expression génique différentielle par transcriptomique (*microarray*), pour mettre en évidence des gènes dont la fonction n'était pas encore connue, puis pour étudier cette fonction par des mutations gain ou perte de fonction.

Ciblage du mésoderme viscéral

Mécanismes moléculaires de différenciation du muscle lisse gastrique

Chez le poulet, le gésier, partie musculaire de l'estomac, possède une couche épaisse de muscle lisse qui facilite la digestion mécanique, alors que le proventricule, ou estomac glandulaire, présente seulement une fine couche musculaire. Dans l'estomac de l'embryon de poulet, la différenciation des CML est observée à partir du neuvième jour après la fécondation. Ainsi la paroi de l'embryon d'estomac de poulet est un modèle intéressant pour étudier les mécanismes moléculaires qui contrôlent la différenciation des CML du tube digestif.

Bmp4, un ligand qui appartient à la superfamille des TGF- β (*Transforming Growth Factor beta*), est exprimé dans le mésenchyme de tout le tube digestif à l'exception du gésier. Quand il est surexprimé, Bmp4 induit une réduction de l'épaisseur de la couche musculaire de l'estomac (Smith *et al.* 2000).

Le développement du tube digestif nécessite l'échange de signaux entre le mésoderme et l'endoderme et de nombreux facteurs moléculaires impliqués sont maintenant connus. Les gènes *Hox* jouent un rôle majeur en induisant la régionalisation du tube digestif selon l'axe antéropostérieur et contrôlent la différenciation de son épithélium, en agissant notamment sur l'expression des morphogènes Bmp, Bmp4 en particulier, et Sonic hedgehog (Shh) (Roberts *et al.* 1995). Bmp4, exprimé dans le mésoderme du tube digestif,

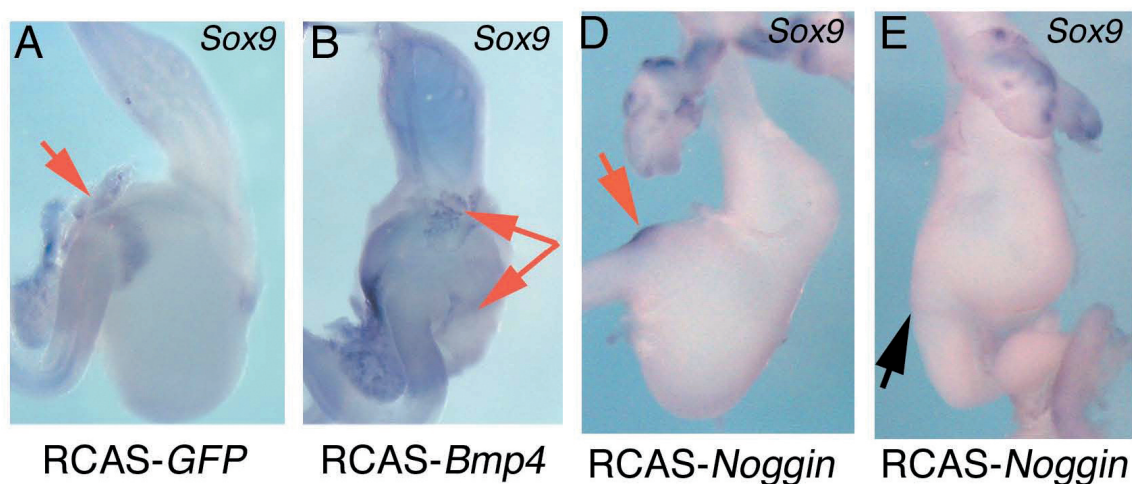


Figure 1 : Hybridation *in situ* réalisée avec la sonde anti-sens Sox9 sur des estomacs d'embryons de huit jours après la fécondation (E8) surexprimant la GFP (**A**), Bmp4 (**B**) et Noggin (**D** et **E**). Le RCAS-GFP injecté constitue l'estomac témoin (**A**). La surexpression de Bmp4 induit une diminution de la couche musculaire du gésier (comparer **B** avec **A**). La surexpression de Noggin donne des phénotypes d'intensités variées (**D**, **E**) : un phénotype modéré (**D**) change le devenir du proventricule avec inhibition de la formation des glandes et le phénotype sévère (**E**) est caractérisé par l'absence de proventricule, l'estomac étant uniquement constitué par le gésier. Les flèches rouges et noires indiquent la zone du sphincter pylorique.

contrôle la différenciation et la croissance des CML de la musculuse (Smith *et al.* 2000). Les gènes *hedgehog* interviennent dans l'organogenèse du tube digestif, le développement du SNE, la prolifération et la différenciation épithéliale. L'importance de ces facteurs dans la régionalisation du tube digestif est mise en valeur par leur remarquable conservation d'expression mais aussi d'action chez les différentes espèces de vertébrés.

L'équipe de Pascal de Santa Barbara s'intéresse à la différenciation du muscle lisse viscéral du tube digestif et notamment de l'estomac chez l'embryon de poulet. Ayant observé que le facteur de transcription SOX9 est exprimé dans le mésoderme du sphincter pylorique, séparant le gésier du duodénum, cette équipe a étudié le rôle de la voie BMP sur l'expression de Sox9. La technique de transgénèse rétrovirale aviaire a été utilisée pour modifier, activer ou inhiber, la voie de signalisation BMP dans le mésoderme de l'estomac par l'intermédiaire de l'expression ectopique de Bmp4 et de Noggin (l'antagoniste des BMPs). Les injections ont été réalisées chez des embryons de stade 10, les œufs ayant été ensuite remis dans un incubateur jusqu'à l'obtention d'un embryon de huit jours après la fécondation (Moniot *et al.* 2004) ; l'impact de ces modulations sur l'expression de Sox9 a été analysé par hybridation *in situ*.

La surexpression de Bmp4 dans l'estomac présomptif induit un phénotype macroscopique caractérisé par une diminution de la taille de l'organe avec une musculature réduite (*figure 1B*). Le domaine d'expression de Sox9 est alors plus étendu autour du sphincter pylorique (*figure 1B*).

A contrario, la surexpression de Noggin induit une hypertrophie musculaire (comparer les *figures 1D* et *1E* avec la *figure 1A*). Les lésions macroscopiques modérées ou sévères sont associées

à une malformation de la zone pylorique et sont corrélées à une altération de l'expression de Sox9 dans la zone pylorique malformée, respectivement diminuée (comparer la *figure 1D* à la *figure 1A*) ou absente (comparer la *figure 1E* à *1A*) selon le degré de l'atteinte lésionnelle. L'ensemble de ces expériences démontre que le contrôle de l'activité BMP est essentiel pour la formation et la délimitation du sphincter pylorique et que Sox9 est un marqueur de cette structure.

Mécanismes moléculaires de différenciation des tendons intermusculaires gastriques

Dans le but d'identifier des facteurs intervenant dans le processus de différenciation précoce des CML viscérales, un profil d'expression par transcriptomique (*microarrays*) a été réalisé entre du muscle lisse gastrique, indifférencié et différencié, respectivement à six et neuf jours de développement (Le Guen *et al.* 2009). L'analyse des profils des gènes d'expression a permis de retrouver des gènes exprimés par le muscle lisse, tels que *Desmin*, *Smooth Muscle Myosin*, *Alpha Smooth Muscle Actin* (α SMA), *Caldesmon*, *Smoothelin*, mais aussi d'identifier des gènes associés à la différenciation des tissus tendineux tels que *Scleraxis*, *Decorin*, *Tenomodulin*. Le gène *Scleraxis*, facteur de transcription, a été identifié comme un nouveau marqueur du mésenchyme gastrique, exprimé dans les cellules des tendons à côté des CML viscérales (Le Guen *et al.* 2009).

L'expression de *Scleraxis*, déterminée par hybridation *in situ*, présente deux zones symétriques sur l'estomac. Le mésenchyme de l'estomac embryonnaire de poulet est composé de CML viscérales qui expriment α SMA, un facteur spécifique des CML, et de cellules intercalées du SNE, positives pour le marqueur des cellules dérivées des crêtes neurales Sox10. De façon intéressante,

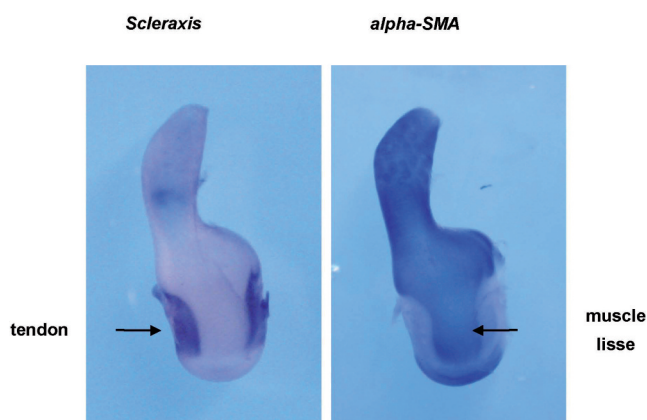


Figure 2 : Hybridation in situ réalisée avec les sondes anti-sens Scleraxis et α SMA sur des estomacs d'embryons neuf jours après la fécondation (E9). α SMA est exprimée dans les cellules musculaires lisses, Scleraxis est exprimé dans les domaines tendineux. Ces deux marqueurs sont mutuellement exclusifs.

les expressions de Sox10 et d' α SMA sont complémentaires de l'expression de Scleraxis. Ce profil d'expression restreint définit les deux tendons intermusculaires associés aux muscles lisses viscéraux (**figure 2**).

Pour mettre en évidence le rôle de Scleraxis dans le développement de l'estomac, une approche perte et gain de fonction a été utilisée (Le Guen *et al.* 2009). Dans l'estomac, la surexpression de Scleraxis induit un phénotype macroscopique caractérisé par un gésier dilaté associé à un proventricule incurvé (**figure 3**). Les cellules surexprimant Scleraxis sont trouvées très concentrées, organisées autour des territoires d'expression endogène, alors que les domaines musculaires sont fortement réduits comme le démontre la diminution de l'expression d' α SMA (**figure 3**). L'inhibition de l'expression de Scleraxis par l'utilisation de rétrovirus portant des ShRNA dirigés contre Scleraxis dans l'estomac aboutit à une altération de développement normal (**figure 4**). L'ensemble de ces expériences montrent la présence de tendon intermusculaire associé à la musculature de l'estomac, tendon qui se développe de manière coordonnée avec les muscles lisses pour aboutir à la formation d'un estomac fonctionnel.

Figure 4 : Hybridation in situ réalisée avec la sonde anti-sens Scleraxis sur des estomacs d'embryons E6 après injection de RCAS-GFP et RCAS-ShScleraxis. Les estomacs injectés avec RCAS-ShScleraxis présentent un gésier plus fin avec un proventricule allongé, par rapport à l'estomac RCS-GFP témoin. Les flèches noires indiquent l'expression normale de Scleraxis dans les tendons, les flèches jaunes montrent la diminution de l'expression de Scleraxis dans les domaines tendineux.

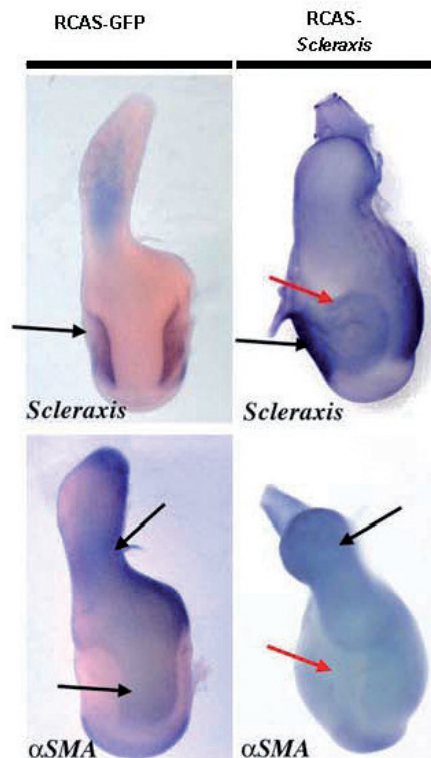
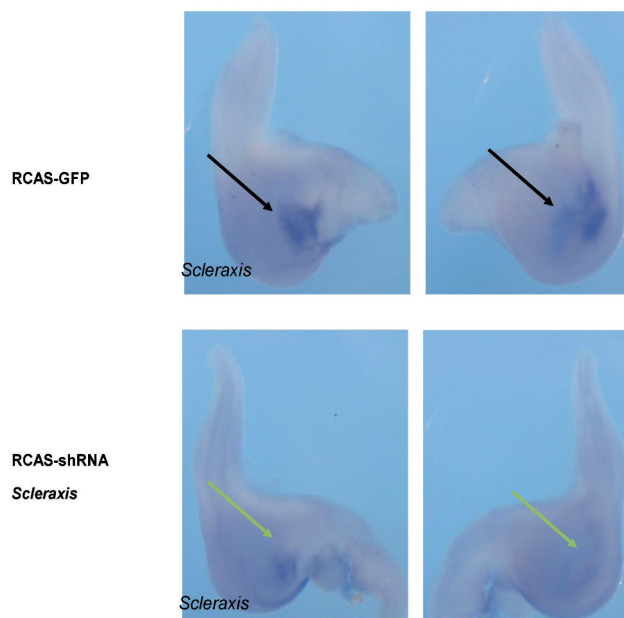


Figure 3 : Hybridation in situ réalisée avec les sondes anti-sens Scleraxis et α SMA sur des estomacs d'embryons E9 surexprimant la GFP ou Scleraxis. L'expression ectopique de Scleraxis (avec le RCAS-Scleraxis) induit un phénotype macroscopique qui, comparé au RCAS-GFP témoin, est caractérisé par un gésier dilaté, associé à un proventricule incurvé. De plus, l'expression ectopique de Scleraxis inhibe l'expression d' α SMA, marqueur des cellules musculaires lisses. Les flèches noires (en haut) indiquent les structures tendineuses endogènes, les flèches noires (en bas) le domaine normal des cellules musculaires lisses et les flèches rouges, une perturbation du mésoderme du gésier.



CONCLUSION

Le modèle poulet a donc relevé le défi des manipulations génétiques. Il constitue maintenant un modèle à nouveau plein d'avenir... (Stern, 2005). Les approches par perte et gain de fonction ont permis d'améliorer notre connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du tube digestif. La différenciation de l'ectoderme et de l'endoderme ont

été plus fréquemment abordés, nous n'en sommes encore qu'aux balbutiements de la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des cellules mésodermiques : la constitution de la couche musculaire lisse du tube digestif et sa régionalisation, et la compréhension des étiologies des malformations et des lésions affectant le tractus digestif qui permettront ensuite d'envisager une thérapie.

REMERCIEMENTS

FB remercie chaleureusement le Professeur Jacques Mercier pour l'accueil dans son unité INSERM U1046, Physiologie et médecine expérimentale du cœur et des muscles, d'octobre 2010 à septembre 2011.

BIBLIOGRAPHIE

- Burns, A.J. & Le Douarin, N.M. 1998. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut : spatio-temporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* 125: 4335–4347.
- de Santa Barbara, P. & Roberts, D.J. 2002. Tail gut endoderm and gut/genitourinary/tail development: a new tissue-specific role for Hox13. *Development* 129: 551–561.
- Dubrulle, J., McGrew, M.J., Pourquie, O. 2001. FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell* 106: 219–232.
- Furth, P.A. 1997. Gene transfer by biolistic process. *Mol Biotechnol.* 17: 139–143.
- Grapin-Botton, A., Majithia, A.R., Melton, D.A. 2001. Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes Dev.* 15: 444–454.
- Ittasaki, N., Bel-Vialar, S., Krumlauf, R. 1999. "Shocking" developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression. *Nat Cell Biol.* 1: E203–207.
- Lecoin, L., Gabella, G., Le Douarin N. 1996. Origin of the c-kit-positive interstitial cells in the avian bowel. *Development* 122: 725–733.
- Le Douarin, N.M. & Teillet, M.A. 1973. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol.* 30: 31–48.
- Le Guen, L., Notarnicola C, de Santa Barbara, P. 2009. Intermuscular tendons are essential for the development of vertebrate stomach. *Development* 136: 791–801.
- Momose T, Tonegawa A, Takeuchi J, Ogawa H, Umesono K, Yasuda K. 1999. Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ.* 41: 335–344.
- Moniot, B., Biau, S., Faure, S., Nielsen, C.M., Berta, P., Roberts, D.J., de Santa Barbara, P. 2004. SOX9 specifies the pyloric sphincter epithelium through mesenchymal-epithelial signals. *Development* 131: 3795–3804.
- Muramatsu, T., Mizutani, Y., Ohmori, Y., Okumura, J.L. 1997. Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo. *Biochem Biophys Res Commun.* 230: 376–380.
- Petropoulos, C., Payne, W., Salter, D., Hughes, S. 1992. Using avian retroviral vectors for gene transfer. *J Virology* 66: 3391–3397.
- Roberts, D.J., Johnson, R.L., Burke, A.C., Nelson, C.E., Morgan, B.A., Tabin, C. 1995. Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development* 121: 3163–3174.
- Rosenblum, C.I. & Chen, H.Y. 1995. *In ovo* transfection of chicken embryos using cationic liposomes. *Transgenic Res.* 4: 192–198.
- Saura-Spengler, T. & Barembaum, M. 2008. Gain- and Loss-of-Function approaches in the Chick embryo. *Methods in Cell Biology* 87: 237–254.
- Smith, D.M., Nielsen, C., Tabin, C.J., Roberts, D.J. 2000. Roles of BMP signaling and Nkx2.5 in patterning at the chick midgut-foregut boundary. *Development* 127: 3671–3681.
- Stern, C.D. 2005. The chick: a great model system becomes even greater. *Developmental Cell* 8: 9–17.